

牛顎下腺中の血清カルシウム低下性因子と白血球増加性因子の分離

著者	篠田 雅人, 鴨川 旭, 中陳 静男
雑誌名	星薬科大学紀要
号	13
ページ	102-108
発行年	1971
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000020/

牛顎下腺中の血清カルシウム低下性因子と白血球増加性因子の分離

篠田 雅人, 鴨川 旭, 中 陳 静 男
星薬科大学¹⁾

Separation of Hypocalcemic and Leukocytosis Promoting Principles from Bovine Submaxillary Gland.

MASATO SHINODA, ASAHI KAMOGAWA, AND SHIZUO NAKAJIN

*Hoshi College of Pharmacy*¹⁾

Hypocalcemic and leukocytosis promoting principles were extracted from bovine submaxillary gland. The hypocalcemic principle was extracted at pH 1.2 with water added dilute hydrochloric acid. This principle was precipitated at pH 4.5, and 15% conc. ammonium sulfate. It had no leukocytosis promoting activity. The leukocytosis promoting principle was extracted at pH 8.0 from residue of extraction at pH 1.2. This principle was precipitated at pH 4.5, and 24% conc. ammonium sulfate. It showed low hypocalcemic activity and high serum-protein decreasing activity.

(Received September 15, 1971)

顎下腺は唾液腺の一員として、各種の消化酵素はすでに衆知の事実であるが、さらに一方では中性および酸性のムコイド、^{2, 3)} カリクレイン様物を生産し、これらを唾液中に外分泌していること

1) Location: Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo.

2) G.Blix, *Z. Physiol. Chem.*, **240**, 43 (1936).; *Acta physiol. Scand.*, **1**, 29 (1940).

3) K.Meyer, *Advances in Protein Chem.*, **2**, 249 (1945).

質,^{4, 5)} 血糖降下性物質,⁶⁾ 血清磷低下性物質⁷⁾ 血清カルシウム低下性および循環白血球増加性物質 (S-パロチン),^{8, 9)} カルシトニン様物質,¹⁰⁾ ガストロン様物質,¹¹⁾ 神経成長促進因子(NGF),¹²⁾ など非常に多種類の生理活性成分が抽出, 分離されており, 著しい多目的な臓器である。この中で, S-パロチンは牛顎下腺のアセトン乾燥粉末から pH8.0 抽出, pH4.5 等電点沈殿, 硫酸分画などにより分離された蛋白質であるが, 現在の精製方法では家兎血清カルシウム低下作用 (以後“Ca-作用”または“Ca-効力”と略す) 家兎循環白血球を一時減少させたのちに増加させる作用 (以後“白血球作用”または“白血球効力”と略す) とが常に共存している。この二つの生物反応の相関性はまだ知られていない。さらに, 他の活性物質はいずれも生物学的にはほとんど単一の活性を示していることから考えて, Ca作用性因子と白血球作用性因子の分離の可能性が充分に考えられる。また, 顎下腺中には多量の粘性性物質が含まれており, pH8.0 で抽出すると粘性が強くなり, その抽出操作が非常に困難であり, 多くの時間を要する。そこで, この点を改良する目的をも併せて, 牛顎下腺から直接に酸性抽出を行ない知見を得たので報告する。

実験方法

抽出原料 : 屠場より入手した新鮮な牛顎下腺を直ちに凍結したのち, 実験に使用した。

生物学的効力試験 : 体重2~3kgの成熟した雄のウサギを1群3~5匹とし, 効力試験の前24時間絶食してから検定に使用した。検定はその投与量を1mg/kgとし, 投与液量が0.5ml/kgになるように蒸留水を加え, pH8.0に調整しながら溶解して作製した。投与はすべて左耳静脈内の注射により行なった。また, 採血は他側の耳静脈から

行なったが, 溶血を起こさないように極力注意した。血清カルシウム量の定量は, 分離した血清0.5mlを蒸留水5mlで稀釈したのち, 3N-KOH1mlでアルカリ性(pH13)とし, ドータイトN-Nを指示薬として0.001M-EDTAによる滴定法で測定した。Ca-効力は, 検体注射後4, 6, および8時間の測定値の, 注射前値に対する変動率を求め, 最大低下率の平均値によって示した。

血清総蛋白に対する効力は, 血清カルシウム量の定量の際に分離した血清について, レフレクトメーターを用いて屈折率から血清総蛋白濃度を測定し, Ca-効力の場合と同様に, 最大変動率の平均値により示した。

循環白血球の測定は白血球用のメランジュールを用いて採血し, Türk液で稀釈したのち, Thoma算定盤により総白血球を計数した。

電気泳動 : 試料をpH9.4の0.05M-硼酸・炭酸ソーダ緩衝液に溶解し, 同一緩衝液に一夜間透折したのち, 不溶部分のある場合は遠心分離して, 可溶部分をチゼリウス型電気泳動装置を用い, 室温で常法の如く電気泳動を行なった。

結 果

I. 顎下腺の酸性抽出

新鮮な牛顎下腺(400g)を肉挽きでよく細切し, HClでpH1.2に調節した水5倍量(2ℓ)を加え, 氷冷しながら, pH1.2に保ち4時間攪拌抽出する。この抽出物を汙過し, 残渣はふたたび抽出を繰返す。このような操作を4回行ない, 汙液を合わせる。この汙液を氷冷下で攪拌しながら1N-NaOHを用いて液性(pH)を徐々に高める。この場合, pHの急激な変化により, 目的のpHを著しく通りすぎないように注意する。そして, pH4.5, 6.2ならびに9.6附近に等電点を示すフラクションを沈殿として分離した。(Fig. 1, [A], [B]および

4) E. Werle, P. Roden, *Biochem. Z.*, **286**, 213 (1936).

5) E. Werle, *Biochem. Z.*, **301**, 329 (1939).

6) C. H. Best, D. A. Scott, *J. Am. Med. Assoc.*, **81**, 382 (1923).; *Am. J. Physiol.*, **100**, 285 (1932).

7) 伊藤四十二, 青沼繁, 篠田雅人, 薬誌, **73**, 1361 (1953).

8) 伊藤四十二, 青沼繁, 篠田雅人, 薬誌, **73**, 1366 (1953).

9) 伊藤四十二, 青沼繁, 滝川映男, 篠田雅人, 薬誌, **76**, 83 (1956).

10) 瀬山義幸, 森陽, 新延信吉, 薬誌, **90**, 149 (1970).

11) 山元正昭, 森本武男, 小林正義, 唾液腺シンポジウム, **9**, 63, (1967).

12) S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **46**, 302 (1960).; R. Levi-Montalcini, P. U. Angeletti, *Physiol. Rev.*, **48**, 534 (1968).

(C)), pH 1.2の抽出残渣には水 2 l を加え, NaOH で pH 8.0 に補正しながら氷冷下で 4 時間攪拌抽出したのち, 滲液を合し, pH 4.5 として遠心分離し, 沈殿 (D) を集める. このようにして得られる各沈殿はいずれも凍結乾燥した. (Fig. I 参照)

ここに得られた各フラクションの収量および Ca-効力を Table I に示した. 収量は pH 1.2 抽出と pH 8.0 抽出の pH 4.5 沈殿 ([A] および [D]) に多く, Ca-効力はこの投与量ではいずれのフラクションにも認められた.

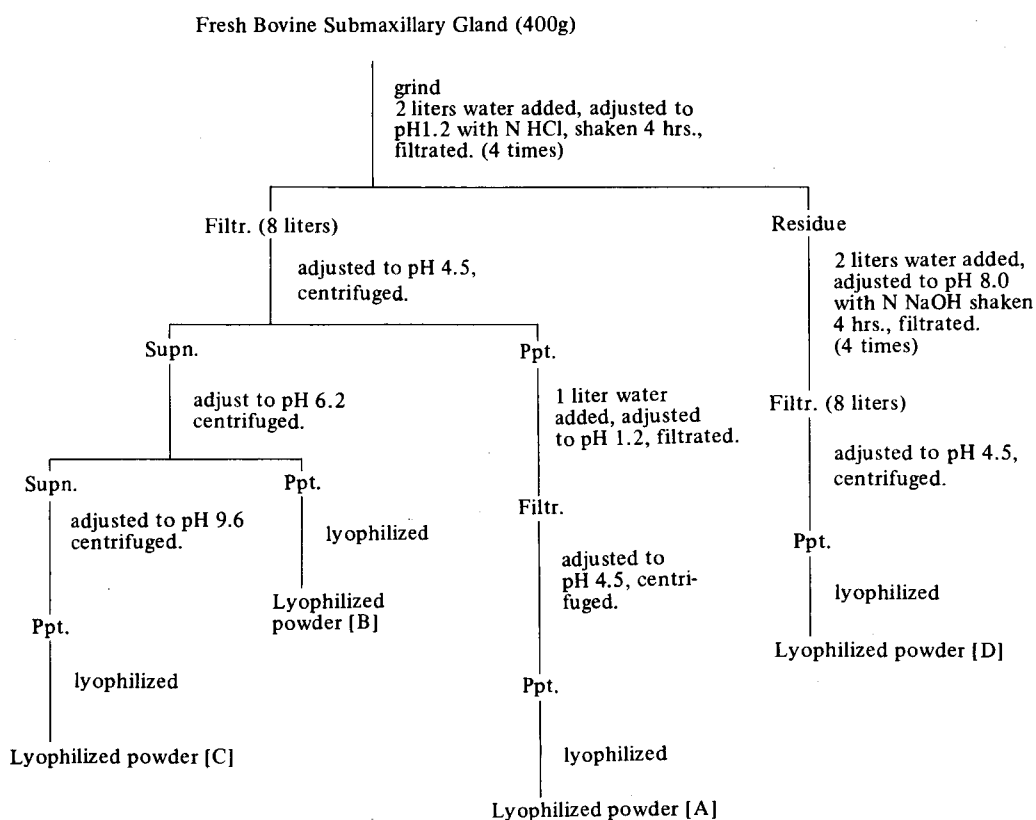
TABLE I. Potency Tests of Each Fraction given in Fig. I.

Fraction	Yield ^{a)} (g)	Hypocalcemic activity (%) ^{b)} mean \pm s. e.
A	11.2	8.31 \pm 0.40
B	1.4	8.95 \pm 1.10
C	1.6	9.54 \pm 0.42
D	9.9	12.68 \pm 4.26

a) from 400g starting material.

b) dose : 1mg/kg rabbit weight
; intravenous injection.

Fig. 1. Extraction of Fresh Bovine Submaxillary Gland with pH 1.2 water.



するフラクションを得た.

II. [A] フラクションのアセトン分画

酸性抽出によって得た [A] フラクションをさらに精製する目的で, アセトン分画を行ない, Fig. 2 に示す如くアセトン 50% および 75% 濃度で沈殿

得られたフラクションの収量と, Ca-効力および血清総蛋白濃度低下作用を測定すると Table II の如くであった. この結果, 両フラクションの効力には著しい差が認められなかった.

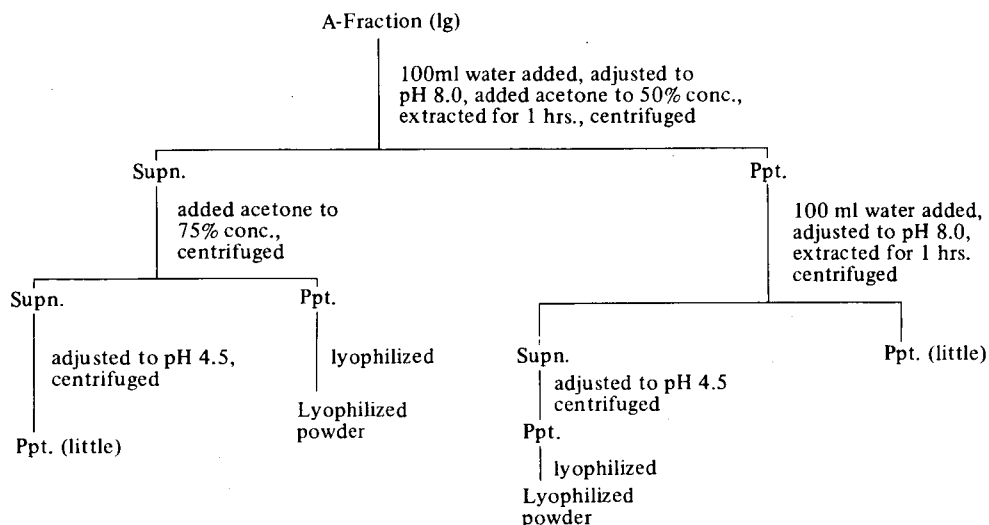


Fig. 2. Fractionation of A-fraction with acetone

TABLE II. Potency Tests of each Fraction with Aceton-Fractionation.

Fraction	Yield ^{a)} (mg)	Hypocalcemic ^{b)} activity(%) mean \pm s.e.	Total protein ^{b)} dec. activity(%) mean \pm s.e.
Aceton 50% Ppt.	375	9.58 \pm 0.39	8.16 \pm 0.76
Aceton 75% Ppt.	83	10.02 \pm 3.61	12.59 \pm 0.10

a) from lg starting material.

b) dose : 1mg/kg rabbit weight, intravenous injection.

Ⅲ.〔A〕フラクションと〔D〕フラクションの硫酸分画

実験Ⅰで得られたpH1.2抽出・pH4.5沈殿〔A〕と酸性抽出残渣からのpH8.0抽出・pH4.5沈殿〔D〕について、Fig. 3およびFig. 4に示すような硫酸分画を行なった。

〔A〕と〔D〕はいずれの場合も硫酸分画により、その大部分が硫酸15%濃度と24%濃度において沈殿することが認められた。分離した各フラクションの収量、Ca-効力および血清蛋白に対する効力をTableⅢに示したが、Ca効力は〔A〕から分離した〔A-15〕および〔A-24〕に認められ、

TABLE Ⅲ. Potency Tests of each Fraction withn (NH₄)₂ SO₄-Fractionation.

Starting material	Fraction	Concentration of (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Yield (mg)	Hypocalcemic ^{a)} activity(%) mean \pm s.e.	Serum protein ^{a)} dec. activity(%) mean \pm s.e.
A-Fraction (4 g)	A-15	15	2000	14.37 \pm 1.92	10.75 \pm 0.36
	A-24	24	110	13.46 \pm 1.67	6.92 \pm 0.77
D-Fraction (4 g)	D-15	15	910	8.35 \pm 2.38	15.05 \pm 1.22
	D-24	24	630	6.61 \pm 1.54	14.73 \pm 7.39

a) dose : 1mg/kg rabbit weight; intravenous injection.

〔D〕から分離した〔D-15〕と〔D-24〕は微弱である。これに対して、血清蛋白に対する作用は〔D〕から得たフラクションの方が強い傾向を示した。

白血球効力に関してはFig. 5に示すように〔D-15〕と〔D-24〕に強く認められ、〔A-24〕は弱く、〔A-15〕にはまったく認められなかった。

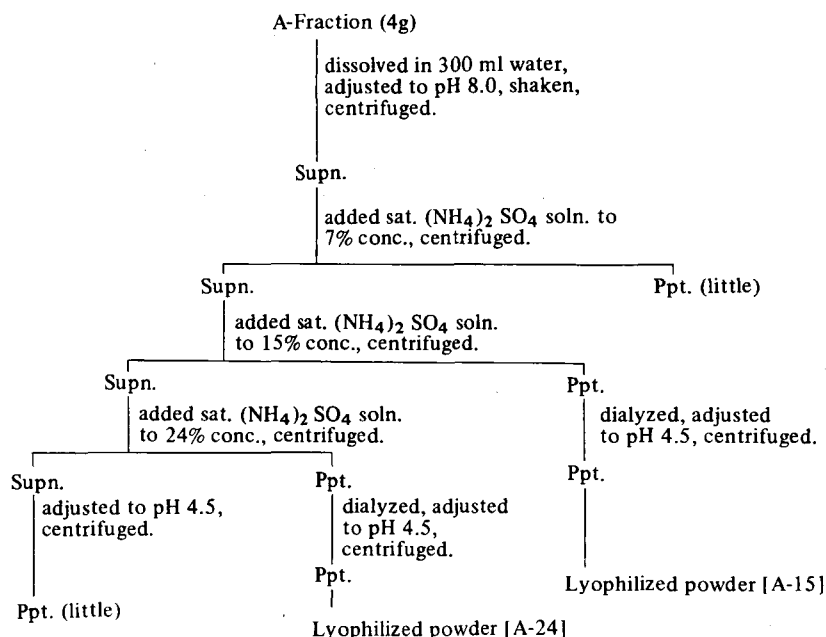


Fig. 3. Fractionation of A-Fraction with Ammonium Sulfate.

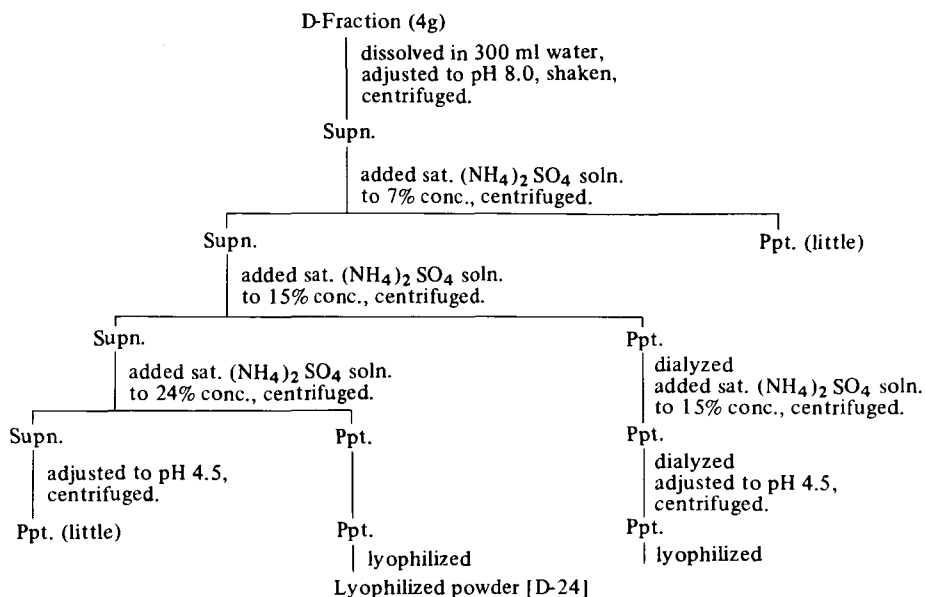


Fig. 4. Fractionation of D-fraction with Ammonium Sulfate.

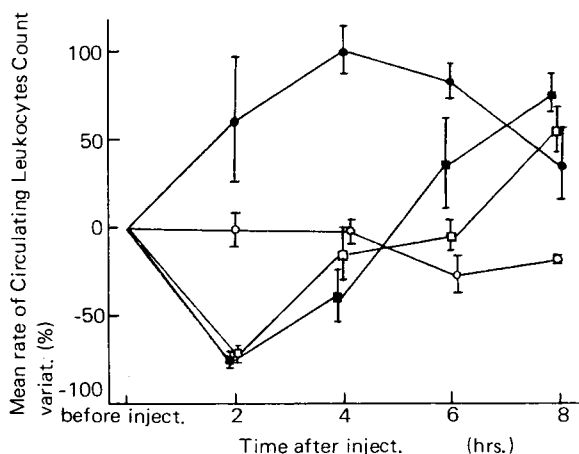


Fig. 5. Effect of each Fraction with Ammonium Sulfate Fraction on Circulating Rabbit Leukocytes Counts.
Dose: 1mg/kg rabbit weight, intravenous injection.
○—○ A-15 ●—● A-24 □—□ D-15
■—■ D-24
Vertical lines; S. E.

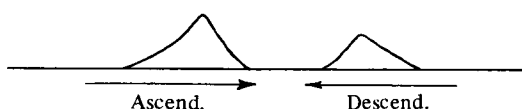


Fig. 6. Electrophoretic Pattern of A-15.
pH 9.4, 0.05M-Borate Buffer, 15°, 10mA, 100V, 60min.

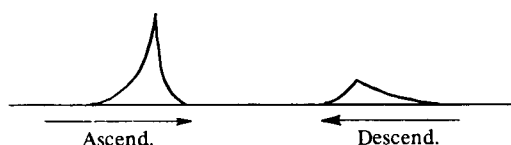


Fig. 7. Electrophoretic Pattern of D-15.
pH 9.4, 0.05M-Borate Buffer, 15°, 13mA, 105V, 60min.

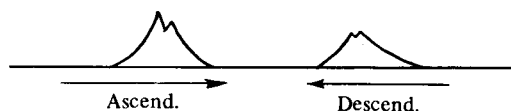


Fig. 8. Electrophoretic Pattern of Mixture of A-15 and D-15. pH 9.4, 0.05M-Borate Buffer, 15°, 12mA, 100V, 60min.

考 察

唾液腺内分泌学説¹³⁾によれば、唾液腺から硬組織の発育に関与するホルモン（唾液腺ホルモン）が分泌しており、これは主として耳下腺でつくられ、顎下腺はこれに協調的に関与していると考え

られている。そして、耳下腺よりパロチン、¹⁴⁾ 顎下腺よりS-パロチン、⁸⁾ 唾液よりサリバ・パロチン・A¹⁵⁾がそれぞれ分離されている。このようにして得られたこれらの成分の生理化学的な研究については多くの総説¹⁶⁾によって紹介されている

13) 緒方知三郎, 日本病理学誌, 3, 332 (1943).; 鉄門, 5, 2 (1943).; 医学綜報, 1, 301 (1946).

14) Y. Ito, A. Mizutani, *Yakugaku Zasshi*, 72, 244 (1952).

15) Y. Ito, S. Okabe, *Endocrinol. Japon.*, 6, 166 (1959).

16) 伊藤四十二, 生化学, 25, 143 (1953); *Endocrinol. Japon.*, 1, 1 (1954); *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85, 228 (1960).

が、そのいずれもがCa-効力と白血球-効力、および血清蛋白に対する作用を有することが報告されている。この中で、血清蛋白に対する作用にはあまり特異性が考えられないが、Ca-効力と白血球-効力はかなり特異性が認められ、それらの効力の酸、アルカリおよび化学試薬に対する安定性に特徴が認められることから、両効力を分離することの可能性が十分に期待されていた。また、特に顎下腺は組織学的にみると漿液細胞と粘液細胞とから成る混合腺であり、pH8.0の水性抽出を行なうと、S-パロチンと同時にムコイドが溶出されて来る。S-パロチンの等電点はpH4.5附近であるが、このムコイドの等電点は大部分がpH3附近と考えられ両者はかなり接近している。従って、pH3よりもやや酸性側で抽出を行うならば、ムコイドの影響を出来るだけ避けながら、S-パロチンを抽出することが出来ると考え、酸性抽出を行なった。

牛顎下腺からpH8.0抽出によりS-パロチンを分離した場合には、ムコイドの影響を避けるために、原料臓器をアセトン乾燥粉末としてから抽出を行なった。^{7, 8)}しかし、酸性抽出の場合には、Fig. 1に示すように、アセトン乾燥粉末にすることなく、直接に生の臓器から抽出することが出来、さらに汙過の操作が容易であるため、1日に抽出操作を2回繰返すことも可能であった。4回の酸性抽出の繰返しにより、酸性での抽出可能な成分を出来る限り溶出したのちに、その残渣について従来通りのpH8.0抽出を行なったが、Table Iに示す如く、酸性抽出の匹適するほどの抽出物が得られたことは、〔A〕と〔D〕のフラクション

について等電点は類似していても物理化学的な性質は相異しているものと考えられる。

S-パロチンは硫安15%濃度では沈殿する性質を有する。⁸⁾そこで〔A〕と〔D〕について同様の硫安分画を行ない (Fig. 3, およびFig. 4), 生物学的性質 (Table III, およびFig. 5) および電気泳動像 (Fig. 6~8) を比較したが、S-パロチンに対応する〔A-15〕と〔D-15〕は明らかに異なった性質であり、Ca-効力は〔A-15〕が示し、白血球-効力は〔D-15〕が示した。この事実は、Ca-作用性因子は酸性 (pH1.2) 抽出により組織から溶出され易いのに対して、白血球-作用性因子は酸性では溶出され難く、微アルカリ性 (pH8.0) になって溶出可能な状態にあるものと考えられる。

総 括

(1)牛顎下腺からpH1.2の酸性抽出により、Ca-効力を示すが、白血球-効力の認められない成分を分離した。この成分はpH4.5および硫安15%濃度で沈殿する。

(2)牛顎下腺の酸性抽出残渣をpH8.0で抽出することにより、Ca-効力は弱い、白血球-効力および血清蛋白低下効力の強い成分を分離した。この成分はpH4.5および硫安24%で沈殿する。

(3)以上の結果から、牛顎下腺中のCa-作用性因子と白血球-作用性因子が酸性抽出を利用することにより分離されることを認めた。

謝辞 本研究に有益な御助言を賜った大阪大学薬学部長、青沼繁教授に感謝いたします。

正 誤 表

誤

正

P. 106

Fig. 3

Ppt.

|

Lyophilized powder [A-15]

P. 106

Fig. 4

Ppt.

|

Ppt.

|

lyophilized

Lyophilized powder [D-24]

Ppt.

|

lyophilized

Lyophilized powder [A-15]

Ppt.

|

dialyzed to tap water
adjusted to pH 4.5,
centrifuged

Ppt.

|

lyophilized

Lyophilized powder [D-24]